



(51) 国際特許分類6 C07K 14/47, C12N 9/14, 15/55, C12Q 1/68, C07K 16/40	A1	(11) 国際公開番号 WO99/00419 (43) 国際公開日 1999年1月7日(07.01.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02836 (22) 国際出願日 1998年6月25日(25.06.98) (30) 優先権データ 特願平9/187398 1997年6月27日(27.06.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岸本利彦(KISHIMOTO, Toshihiko)(JP/JP) 丹羽真一郎(NIWA, Shin-ichiro)(JP/JP) 〒244-8588 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP) 田村隆明(TAMURA, Taka-aki)(JP/JP) 牧野泰孝(MAKINO, Yasutaka)(JP/JP) 〒263-0022 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千葉大学理学部生物学科内 Chiba, (JP)		(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PROTEIN CAPABLE OF COMBINING WITH TBP TO FORM COMPLEX, POLYNUCLEOTIDE CODING FOR SAID PROTEIN, ANTI-SENSE POLYNUCLEOTIDE OF SAID POLYNUCLEOTIDE, AND ANTIBODY CAPABLE OF RECOGNIZING SAID PROTEIN (54) 発明の名称 TBPと複合体を形成する蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド及び該蛋白質を認識する抗体 (57) Abstract A protein comprising an amino acid sequence described in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 of sequence listing, a variant thereof, and a homologous protein thereof, the protein being able to combine with TBP to form a complex and in addition having ATPase and DNA helicase activities; a gene coding for the above protein; and an antibody which can specifically bind to the protein.		

Pramod B. Mahajan
Serial No. 10/782,436REF
A2

(57)要約

本発明は、配列表の配列番号 1 又は配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、その変異体及びそのホモログ蛋白質である。本発明の蛋白質は、TBP との複合体を形成する能力を有し、さらには、ATPase 活性並びに DNA ヘリケース活性を有する。本発明はまた、上記蛋白質をコードする遺伝子である。本発明はまた、上記蛋白質に特異的に結合する抗体である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シネラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BC	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	HR	クロアチア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウエー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン						

明 細 書

TBPと複合体を形成する蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド及び該蛋白質を認識する抗体

技術分野

本発明は、哺乳動物の各組織に広く存在し、TBPと複合体を形成する蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド及び該蛋白質を認識する抗体に関するものである。

背景技術

癌の発症は遺伝子の何らかの異常によって起こることが知られており、特に、遺伝子の転写レベルでの変動異常が癌の発症の主たる原因となると考えられている。癌の原因遺伝子の究明は、癌の発症機構の解明や癌の診断法、治療法の開発等を実現するために不可欠な重要課題であり、該遺伝子の探索は1980年頃より盛んに行われてきた。

一方、遺伝子転写における中心的な因子としては、TBP (TATA binding protein) が、生物の全遺伝子の転写に関わっていることが知られている。具体的には、DNAからmRNAへの転写が行われるときにTBPが該DNAのプロモーター領域に結合することで遺伝子の転写制御が行われていると報告されている。そうすると、各遺伝子のそれぞれ異なる転写制御に対応するだけの機能をTBPは持つことになるが、これはTBPが他の多様な蛋白質と複合体を形成することで、その相手の蛋白質や複合体の構造により、それぞれの機能を持つことになると考えられている。

上記のTBPと複合体を形成する蛋白質としては、これまでにTAFs (TBP associating factors) やDr1、Dr2といった遺

伝子の転写に関連すると考えられるものから、Tat、p53、Rb等の癌関連遺伝子等まで幅広く同定されている。

一方、本発明者らのうちの田村、牧野によって、微量しか発現されない蛋白質又は抗原性の低い蛋白質及びそれらをコードする遺伝子の取得方法が明らかにされた（『バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法』pp11～16、pp27～37、pp189～196及びpp215～219（羊土社、1993年））。

本発明者らは、上記の方法を用いて、TBPと結合しかつ癌で特異的に発現が増加する蛋白質として、TIP120蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子及び該蛋白質に対する抗体を、特開平9-77792号公報に開示した。

発明の開示

本発明は、遺伝子転写における中心的な因子であるTBPと複合体を形成する新規な蛋白質の取得を目的とするものである。

また、本発明は、前記蛋白質をコードする遺伝子又は前記蛋白質を認識する抗体を提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、該抗体を用いて該蛋白質の検出を可能ならしめることを目的とするものである。

さらに、本発明は、前記のTBPと複合体を形成する蛋白質のホモログの取得方法ならびに該方法により取得されたホモログ蛋白質及びそれらの蛋白質をコードする遺伝子を提供するものである。

本発明者らは、前記の田村、牧野の方法を改良した方法を用いて、TBPと複合体を形成する蛋白質であってその分子量が49kDである蛋白質（TIP49と命名した。）の遺伝子（TIP49遺伝子）の塩基配列を決定した。そして、該遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定した。

さらに、TIP49遺伝子がコードする組み換え蛋白質を作製し、該組み換え

蛋白質が天然に存する T I P 4 9 と同じ性質を有することを確認した。

また、T I P 4 9 遺伝子の一部の DNA をプローブとして用い、そして該プローブである DNA が得られた c DNA ライブラリーとは別の c DNA ライブラリーから、該プローブがハイブリダイズする c DNA (T I P 4 9 遺伝子のホモログ) を取得し、該 c DNA がコードするアミノ酸配列を決定した。

また、T I P 4 9 蛋白質を該蛋白質が由来する動物以外の動物に免疫することにより、該蛋白質を認識する抗体を得、該蛋白質の抗原性を確認した。

すなわち、本発明は、以下の蛋白質を提供する。

1. 以下の (a) 及び (b) からなる群から選択される蛋白質、

(a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) T B P との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

2. 以下の (c) 及び (d) からなる群から選択される蛋白質、

(c) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(d) T B P との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

3. さらに、A T P s a e 活性を有する前記 1 又は 2 に記載の蛋白質。

4. さらに、DNA ヘリケース活性を有する前記 1 ないし 3 のいずれか一つに記載の蛋白質。

5. 以下の (e) 及び (f) からなる群から選択される蛋白質、

(e) T B P との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の一部からなる蛋白質、

(f) T B P との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の一部において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加さ

れたアミノ酸配列からなる蛋白質。

6. 以下の (g) 及び (h) からなる群から選択される蛋白質、

(g) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の一部からなる蛋白質、

(h) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の一部において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

7. さらに、ATPase 活性を有する前記 5 又は 6 に記載の蛋白質。

8. さらに、DNA ヘリケース活性を有する前記 5 ないし 7 のいずれか一つに記載の蛋白質。

また、本発明は、以下のポリヌクレオチドを提供するものである。

9. 前記 1 ないし 8 のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする DNA。

10. 配列表の配列番号 2 又は配列番号 4 に記載の塩基配列からなる DNA。

11. 前記 9 又は 10 に記載の DNA がコードする RNA。

12. 前記 9 又は 10 に記載の DNA のアンチセンス DNA 或いは前記 11 に記載の RNA のアンチセンス RNA、又はそれらの誘導体からなるアンチセンスポリヌクレオチド。

13. 前記 9 ないし 12 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する 12 塩基以上からなるポリヌクレオチド。

14. 前記 9 ないし 12 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する 16 塩基以上からなるポリヌクレオチド。

15. 前記 5 ないし 8 のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする DNA のアンチセンス DNA、或いは前記 5 ないし 8 のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする DNA がコードする RNA のアンチセンス RNA、又はそれらの誘導体からなるアンチセンスポリヌクレオチドであって、GC 含有率が 30～70% であるポリヌクレオチド。

16. 化学修飾された前記9ないし15のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド。

17. 本発明は、前記10に記載のDNAのホモログであるcDNAを取得する方法であって、前記13ないし15のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドをプローブとして、cDNAライブラリーから該ポリヌクレオチドとハイブリダイズするcDNAを取得する方法を提供するものである。

18. また、本発明は、配列表の配列番号2又は配列番号4に記載の塩基配列からなるDNAのホモログであって、前記のcDNAの取得方法によって取得されたcDNAを提供するものである。

19. また、本発明は、配列表の配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質のホモログであって、前記のcDNAがコードするアミノ酸配列からなる蛋白質を提供するものである。

20. また、本発明は、前記1ないし8又は19のいずれか一つに記載の蛋白質を認識する抗体（ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）を提供するものである。

21. また、本発明は、前記1ないし8又は19のいずれか一つに記載の蛋白質を認識するモノクローナル抗体の活性フラグメントを提供するものである。

22. また、本発明は、前記1ないし8又は19のいずれか一つに記載の蛋白質を検出する方法であって、該蛋白質を認識する抗体を用いることを特徴とする検出方法に関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、ラット肝細胞核抽出液の二次元電気泳動の結果を示す電気泳動写真である。Mは分子量マーカーである。矢印は、アミノ酸配列決定を行ったドットである。

図2は、ラットTIP49蛋白質のアミノ酸配列及びTIP49遺伝子の塩基

配列を示す図である。

図3は、ラットTIP49蛋白質及び遺伝子と原生動物のRuvB蛋白質及び遺伝子とのホモロジーを蛋白質間及び遺伝子間それぞれについて示す図である。

図4は、ラット肝細胞由来のpolyA RNAについてTIP49遺伝子の一部をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションした結果を示す電気泳動写真である。

図5は、ラット各組織由来のpolyA RNAについてTIP49遺伝子の一部をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションした結果を示す電気泳動写真である。

図6は、実施例4でTIP49遺伝子を導入するのに使用したヒスチジントグを導入したpET3a-Hisベクターを示す図である。

図7は、組み換え体TIP49を発現させた大腸菌の溶菌液及びその精製蛋白質について電気泳動を行った結果を示す電気泳動写真である。

図8AはTIP49蛋白質を精製したMonoQのカラムパターンを示す図であり、図8BはTIP49蛋白質を精製した精製蛋白質の電気泳動（クマシー染色）の結果を示す電気泳動写真である。

図9は、ラット肝細胞核抽出液、該核抽出液から粗精製したTIP49及びNi-NTAアガロースカラムで精製した組み換えTIP49について、それぞれ抗TIP49抗体を用いてウェスタンブロット法による解析を行った結果を示す電気泳動写真である。

図10は、HA-TBPを動物細胞内で発現させて、その核抽出液を抗HA抗体で免疫沈降した沈降物及び上清ならびにラット肝細胞核抽出液についてウェスタンブロット法による解析を行った結果を示す電気泳動写真である。なお、一次抗体として、図10中の上段（a）は抗TBP抗体を、中段（b）は抗HA抗体を、下段（c）は抗TIP49抗体をそれぞれ用いてウェスタンブロット法による解析を行った結果である。

図11は、Mono Qで精製したTIP49のATPase活性を、液体シンチレーションカウンターで測定した結果を示す図である。

図12は、Mono Qで精製したTIP49のATPase活性を、種々の核酸を添加して、液体シンチレーションカウンターで測定した結果を示す図である。

図13は、Mono Qで精製したTIP49とサンプルDNAとを反応させた反応物を電気泳動した結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、後述するように、実施例としてラットの肝臓から、TBPと複合体を形成するTIP49を単離し、さらに実施例10で示したようにヒトTIP49遺伝子を取得した。TBPが生物の全ての遺伝子の転写の中心因子であることから、ラットやヒト以外の生物が、今回単離した蛋白質と同じ機能をもつ蛋白質を有していることが非常に高い可能性をもって考えられる。それゆえ、実施例10で開示した方法により、ヒト又はラット以外の他の生物からTIP49のホモログが得られる。また、実施例4で実証したようにTIP49遺伝子が各組織に広く存在すること及び実施例2で示したようにTIP49遺伝子がDNA障害に関与する遺伝子であることから、TIP49遺伝子は肝臓だけではなく各組織でのDNA障害に関与する遺伝子であることが強く示唆される。

もちろん、種によってそのアミノ酸配列にいくらかの相違はあるが、一般的には異種間の同一機能の蛋白質については30%～40%以上のホモロジーがあると言われている。ここでいうホモロジーがあるということは、一般に言われているのと同じく、同族アミノ酸をポジティブとカウントする算出法によるものであり、アミノ酸鎖の長さが異なる場合は、アミノ酸鎖が短い方の蛋白質の長さに対して、ホモロジーがある部分の割合がいくらかを表す。

TIP49をラットとヒトとの間において比較すると、アミノ酸レベルではわずかに1アミノ酸が異なるだけであり、種間においてアミノ酸配列が非常によく

保存された蛋白質である。

本発明のT I P 4 9の機能は、T B Pと複合体を形成すること、A T P a s e活性を有すること又はD N Aヘリケース活性を有することを特徴とするが、これらについては、例えば実施例7ないし9で開示した方法をそれぞれの場合で用いて確認すればよい。

本発明は、T I P 4 9蛋白質の変異体として、上記機能を有し、且つ配列表の配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列において一又は複数（例えば1～十数個）のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質を含むものである。

アミノ酸の置換、欠失又は付加は、たとえば部位特異的突然変異誘発(site directed mutagenesis)によって塩基配列に変異を起こさせることにより行うことができる。具体的には、所望の変異（ミスマッチング）を有する他は変異を受けべきD N Aに相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、D N Aの塩基配列の一部を所望の配列に置換させること、所望の配列を欠失又は付加することが可能である。更には、部位特異的突然変異誘発を2ないし3回繰り返すことにより、より大きな範囲の塩基配列を置換、欠失又は付加することも可能であり、又は塩基配列の離れた部位に同時に変異を起こさせることも可能である。

また、塩基配列の置換、欠失又は付加は、遺伝子を突然変異誘発剤で処理する方法、又は、遺伝子を選択的に開裂し次いで選択されたヌクレオチドを除去及び／又は付加しそして遺伝子を連結する方法により行うことも可能である。

本発明のT I P 4 9又はT I P 4 9の変異体をコードするD N A又はR N Aは、縮重による全ての塩基配列からなるものである。

D N Aのセンス鎖又はR N Aについては、その塩基配列と相補な塩基配列からなるアンチセンスD N A又はアンチセンスR N Aがそれぞれ存在する。本明細書では、特に断りがない限り、D N A又はc D N Aとはセンス鎖とアンチセンス鎖の二本鎖からなるものを指し、R N Aとは一本鎖を指し、アンチセンスD N A又

はアンチセンスRNAとは一本鎖を指す。

本明細書においては、ポリヌクレオチドとは、DNA又はRNA、又はそれらにさらに塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが1又は複数結合したものをいい、天然に存在するもの又は天然に存在しないもののいずれも含む。アンチセンスポリヌクレオチドについても同様である。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドには、その立体構造や機能がポリヌクレオチドと類似する誘導体が全て含まれる。例えば、ポリヌクレオチドの3'末端もしくは5'末端に他の物質が結合したものとポリヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において置換や欠失や付加の修飾が生じたもの、天然に存在しないような塩基、糖、リン酸を有するものや、糖-リン酸骨格以外の骨格を有するものである。

該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、TIP49又はTIP49の変異体をコードするポリヌクレオチドのコード領域のいかなる部分にハイブリダイズするものであってもよい。なお、mRNAの一部に対して相補的な塩基配列を有し、該mRNAにハイブリダイズするものが好ましい。

アンチセンスポリヌクレオチドは、

- ①遺伝子からpre-mRNAへの転写段階、
- ②pre-mRNAから成熟mRNAへのプロセッシング段階、
- ③核膜通過段階、
- ④蛋白への翻訳段階

のいずれかで、遺伝情報を担うDNA又はmRNAに結合し、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えて蛋白質の生合成を阻害することにより該蛋白質の発現を調節すると考えられている。

ハイブリダイズのし易さの点では、一般的には、ステムループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチド誘導体を設計するとよいとされている（『臨床免疫

25巻』1200～1206頁、1993年)。

また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる(『癌と化学療法 20巻13号』1899～1907頁)。したがって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体であって、TIP49遺伝子又はTIP49をコードするmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の相補的な配列を含むものは、高い発現抑制効果が期待される。

誘導体としては、現在一般に知られている誘導体のうち、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一つが高められた誘導体であることが好ましく、特に好ましくは、当該誘導体は、フォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体である。本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体についても、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体の製造は慣用の方法を用いて行うことができる。例えば、天然型のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成したり、TIP49遺伝子を鋳型としてPCR法を行うことにより本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを得ることができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機(例えば、パーキンエルマージャパン社製394型)を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されている説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによって、目的のアンチセンスポリヌクレオチド又はその誘導体を得ることができる。

本発明のポリヌクレチド又はアンチセンスポリヌクレオチドの全長又はその一部はTIP49遺伝子を検出するためのプローブとして用いることができる。

さて、ヒトの蛋白質の種類は 3×10^9 個といわれている。16塩基のDNA

は 4^{16} 種類存在するので、この長さのDNAであればヒトの全ての蛋白質を特異的に識別できると考えられる。すなわち、プローブとして必要な長さは理論的には16塩基である。実用上もこの長さ以上であることが望ましいことは言うまでもないが、実用的には12塩基以上で用いられることが多い。

また、プローブとして用いる箇所は、非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。ポリヌクレオチドの立体構造によりGC含有率が30ないし70%であるものがハイブリダイズし易い点で好ましい。

プローブとして用いる本発明のポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチドは、標識化しておくことで、該ポリヌクレオチド又はアンチセンスポリヌクレオチドを検出することが可能となる。標識の手段としては、放射性同位元素(RI)、蛍光物質(FITCやローダミン等)、酵素又はアビジン若しくはビオチンを用いることが好ましい。特に、RIを用いることが好ましい。

TIP 49 遺伝子を検出する方法としては具体的には、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法やRT-PCR法(『Current Protocols in Molecular Biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Juter Science) Chapter 15)又はインサイチュハイブリダイゼーション法(同書Chapter 14)が挙げられる。

なお、ハイブリダイズの条件は、プローブの長さや使用するメンブランにより最適な条件が異なる。つまり、ハイブリダイズ条件は自ずから或る幅をもつものである。本発明の実施例では、使用したメンブランの性質と得ようとしたプローブの長さにおける最適な条件を開示するものであり、メンブランやプローブの長さが異なれば当然異なるハイブリダイズ条件でもハイブリダイズし得る。例えば、ピロリン酸ナトリウムがなくてもハイブリダイズする場合もある。その範囲としては、目安として以下の条件が挙げられる。

ハイブリダイズ条件：

①プレハイブリダイゼーション

6以上10以下xSSC

5以上10以下xDenhardt's

0.1%以下ピロリン酸ナトリウム

約100 μ g/ml熱変性DNA

0.1以上1%以下SDS

総液量 約50ml

反応温度35以上37℃以下

反応時間50以上70分間

②ハイブリダイゼーション

6以上10以下xSSC

5以上10以下xDenhardt's

0.1%以下ピロリン酸ナトリウム

約100 μ g/ml熱変性DNA

1 $\times 10^5$ 以上2 $\times 10^6$ cpm/ml以下cDNAプローブ

反応温度35以上42℃以下

反応時間12時間以上20時間以下

DNA又はRNAを化学合成するときに、側鎖をメチル化すること、あるいはビオチン化すること、又はリン酸基部分のOをS置換すること等の化学的に修飾することはよく知られている。例えば、配列表の配列番号2又は4に記載のDNAを化学合成するときに、該化学修飾を行い、配列表に示されたDNAそのものとは異なるDNA（誘導体）を合成することが可能である。

したがって、本発明のDNA及びRNAは、上記の化学修飾された、DNA、RNA又はアンチセンスポリヌクレオチドをその範囲に含むものである。本発明においては、化学修飾されたDNA又はRNAは、蛋白質をコードする機能又はプローブとしての機能のいずれかを発揮可能なものであれば特に問題なく、また

化学修飾されたアンチセンスポリヌクレオチドは、プローブ又は蛋白質の生合成を阻害する機能又はプローブとしての機能のいずれかを発揮可能なものであれば特に問題なく使用可能である。なお、標識化は化学修飾に含まれる。

本発明は、T I P 4 9 の抗原性について、実施例 5 に例示するように、該 T I P 4 9 が由来する動物以外の動物に免疫することで容易に抗体が得られるものであることを明らかにするものである。したがって、本発明の T I P 4 9 を認識する抗体は、T I P 4 9 を該 T I P 4 9 が由来する動物以外の動物に免疫感作することにより得られる抗血清及びポリクローナル抗体であって、該抗体が本発明の T I P 4 9 を認識することがウェスタンブロット法、E L I S A 法や免疫染色法（例えば F A C S での測定）等により確認されるものをその範囲内に含む。

また、免疫原として、蛋白質の一部、又は該蛋白質の一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いることはよく行われる方法である。該蛋白質の一部は、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。なお、蛋白質の一部としては、8 アミノ酸残基以上であることが好ましい。

抗原性が明らかとなった物質については、免疫感作によってポリクローナル抗体が得られるならば、該免疫した動物のリンパ球を用いたハイブリドーマによりモノクローナル抗体が産生されることはよく知られている（『Antibodies A Laboratory Manual』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988）Chapter 6）。したがって本発明の T I P 4 9 を認識する抗体はモノクローナル抗体もその範囲内に含むものである。

本発明においては、抗体は活性フラグメントをも包含するものである。活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味し、具体的には、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ などを挙げることができる。

例えば、本発明の抗体をペプシンで分解すると $F(a b')_2$ が得られ、パパインで分解すると $F a b$ が得られる。 $F(a b')_2$ を 2-メルカプトエタノー

ルなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化するとF a b' が得られる。F vは重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーで結合させた一価の抗体活性フラグメントである。

これらの活性フラグメントを保持し、その他の部分を他の動物のフラグメントに置換することでキメラ抗体が得られる。

T I P 4 9の検出については、抗体を用いる方法、酵素反応を利用する方法が挙げられる。

抗体を用いる方法としては具体的には、①T I P 4 9を認識する抗体を用いてT I P 4 9を検出する方法、②T I P 4 9を認識する抗体及び該抗体の標識二次抗体を用いてT I P 4 9を検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素（R I）、酵素、アビジン又はビオチン、もしくは蛍光物質（F I T Cやローダミン等）が利用される。

酵素反応を利用する方法としては、例えば、E L I S Aが挙げられる。

実施例

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

<実施例1> T I P 4 9 遺伝子の単離及びT I P 4 9のアミノ酸配列の決定

1. ラット核抽出液の調製

『バイオマニユアルシリーズ5 転写因子研究法』p p 27~37（1993年、羊土社）に記載の方法の通りにラット肝細胞核抽出液を25ml調製した。

具体的には、以下のように行った。各操作は、4℃にて行った。

ラットより肝臓（20g）を摘出し、冷P B Sにつけ、その後P B Sで3回洗浄した。次いで、組織をハサミでぎざみ、ホモジェナイザーに移した後、シヨ糖溶液I（10mM H e p e s（pH7.6）、15mM K C l、0.15mM スベルミン、0.5mM スベルミジン、1mM E D T A、2.2M シヨ糖、5% グリセリン、0.5mM D T T、0.5mM P M S F、14μ

g/ml アプロチニン) を 60 ml 加えホモジェナイズした。遠心チューブにシヨ糖溶液 II (10 mM Hepes (pH 7.6)、15 mM KCl、0.15 mM スペルミン、0.5 mM スペルミジン、1 mM EDTA、2 M シヨ糖、10% グリセリン、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、14 μ g/ml アプロチニン) を 10 ml 入れ、その上にホモジェナイズして得た試料を重層し、24,000 rpm で 50 分間遠心した。沈殿を 5 ml の核溶解液 (10 mM Hepes (pH 7.6)、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、10% グリセリン、3 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.1 mM PMSF、14 μ g/ml アプロチニン) に懸濁し、全容量を測定した。この液の 260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を、0.5~1.0 mg/ml に調製した。KCl を終濃度が 0.55 M になるように加え、ゆっくり混合した後、15 分間振とうし、核を溶解した。次いで、40,000 rpm で 60 分間遠心した。遠心上清を回収し、硫酸アンモニウムを液量 1 ml に対し 0.3 g 加えて硫酸沈殿を行い、35,000 rpm で 30 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を少量 (0.2~0.5 ml) の透析液 (25 mM Hepes (pH 7.6)、0.1 mM EDTA、40 mM KCl、10% グリセリン、1 mM DTT) に溶かし、溶解液をさらに上記の透析液に透析した。透析終了後、再び遠心 (12,000 rpm、5 分間) を行い、上清を回収し、蛋白質濃度を 260 nm 及び 230 nm の吸光度を測定することにより 10 mg/ml に調節して核抽出液を得た。得られた核抽出液は、使用まで -80℃ にて保存した。

『バイオマニュアルシリーズ 5 転写因子研究法』pp 215~219 (1993 年、羊土社) に記載の方法を基としてラット肝細胞核抽出液から蛋白質を単離した。実際には、TFIID 画分の代わりにラット肝細胞核抽出液を用いた。

2. 二次元電気泳動

1) 上記ラット肝細胞核抽出液をニッケルカラム (Ni-NTA アガロース

(キアゲン社製) 1 ml をブレップカラム (バイオラッド社製) に詰めたもの) に通すことで処理したもの 800 μ l と HXmTBP-C (ヒスチジンを6コつないだタグを有するマウス TBP の C 末端部分蛋白質 (Nucleic Acids Res. 22, 1179-1185(1994年) 参照) 240 μ l を 4°C で 12 時間反応させた後、反応液に 50% スラリーのニッケル NTA P アガロース (キアゲン社製) 80 μ l を加え、4°C で 1 時間反応させた。

2) 上記で生成した反応物質 (ゲル) を取り、NP 0.1 (20) (25 mM HEPES/KOH (pH 7.9)、10% グリセロール、0.1 M KCl、0.5 M NaCl、0.1% NP-40、20 mM イミダゾール塩酸 (pH 7.9)、1 mM PMSF、0.5 mM 2ME) 緩衝液で洗浄した後、8 M 尿素溶液 (8 M 尿素、0.1 M NaH_2PO_4 、0.01 M Tris) 100 μ l で 20 分間溶出することを 4 回繰り返した。

3) 溶出液に 1/4 容量の TCA 溶液 (100% (w/v) TCA、4 mg/ml デオキシコール酸) を加え 4°C で 30 分間放置した後、15000 rpm で 30 分間遠心した。

4) 遠心分離後、上清を取り除き、沈殿を 100% のアセトン 1 ml で 3 回洗浄した。

5) アセトンを真空ポンプを用いて吸引して取り除いた後、5 μ l の 8 M 尿素溶液と 1 μ l の 2D サンプル溶液 (1.7% SDS、3.3% Triton X-100、2.4 M 2-メルカプトエタノール、1/3 容量の Bio-Lyte 3/10 (BIO-RAD 製)) で沈殿を懸濁し、これをサンプルとして等電点電気泳動用のチューブゲルに乗せた。

6) サンプルにサンプル保護溶液 (2% Triton X-100、1/20 容量の Bio-Lyte 3/10) を 5 μ l 重層した。上部泳動液として 0.1 N NaOH 溶液、下部泳動液として 0.06% H_3PO_4 溶液を用い、400 V で 10 分間、800 V で 45 分間泳動した。

7) 泳動後、ゲルを取り出しSDS還元溶液(125mM Tris/HCl (pH 6.8)、10%グリセロール、2% (w/v) SDS、0.72M 2-メルカプトエタノール、0.00125% (w/v) ブロモフェノールブルー)に10分間浸した後、SDS-PAGE用スラブゲルに乗せて、35mAで3時間、電気泳動を行った。

8) SDS-PAGEの後、エレクトロブロッティング装置(日本エイドー製)を用いて、常法によりゲルからメンブラン(ミリボア製)に蛋白質を転写した。その後クマシーブリリアントブルー染色した。

二次元電気泳動の結果を図1に示す。

3. ラット核抽出液中蛋白質の部分アミノ酸配列の決定

メンブランに転写された各ドットの部分をカッターナイフを用いて切り出し、これをリジルペプチダーゼ消化後、高速液体クロマトグラフィーで各ペプチド断片に分画し、そのうち一つをプロテインシーケンサー(ベックマン製)で解析した。図1において矢印で指し示したドットから未知のアミノ酸配列(下記配列①ないし④)からなるペプチド断片が4つ得られた。

①MKIEEVKSTTK

②QAASGLVGQENA

③EVYEGEVTEL

④ILADQQD

4. ラット肝細胞核抽出液中蛋白質に対応するDNAプローブの合成

1) 上記④のアミノ酸配列に基づいて下記配列⑤又は⑥の塩基配列で表されるDNAプローブを、上記③のアミノ酸配列に基づいて下記配列⑦の塩基配列で表されるDNAプローブを、DNA合成装置(ABI製)を用いて合成した。

⑤GCIGATCAIC AIGATCGITA CATG

⑥GCICATCAIC AIGATAGRTA CATG

⑦GAIGTITATG AIGGIGAIGT

なお、A はアデニン、T はチミン、G はグアニン、C はシトシン、I はイノシン、R はアデニン又はグアニンである各塩基を表す。

2) 上記配列⑤ないし⑦で表されるDNAプローブをTakara MEGA LABELキット（登録商標、宝酒造社製）を用いて取扱説明書の通りに標識した。

3) 次に、下記の組成のDNA反応液を調製し、この液を37℃で30分間インキュベートした後、70℃で10分間熱処理し、酵素を失活させた。

DNAプローブ (2 pmol/μl)	3 μl
10倍ホスホライレイション緩衝液	3 μl
[γ- ³² P] ATP (370 MBq/ml) (アマシャム製)	5 μl
T4 ポリヌクレオチドキナーゼ	1 μl
合計 10 μl	

4) T50E (50mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA) で平衡化されたSephadex G-25（登録商標、ファルマシア社製）を1.5mlポリプレップカラム（バイオラッド社製）にベッドボリュームが1mlになるように詰め、3) で熱処理をしたDNA反応液を該カラムに載せた。

5) その後、200 μlのT50Eをカラムに4回流し、2回目の200 μlで溶出してきた画分をDNAプローブ画分として以後の操作に用いた。

5. ラット肝細胞核抽出液中蛋白質に対応するDNAプローブを用いたラット肝臓cDNAライブラリーからの遺伝子の取得

1) ウィスター系ラット肝臓cDNAライブラリーを、タイムセイバーcDNAシンセシスキット（登録商標、ファルマシア社製）を用いて常法により作製した。該cDNAライブラリーを用いて10⁶程度のブラークをNZY寒天培地上に作製した。このcDNAライブラリーを『Molecular Cloning Second Edition』（1989年、Cold Spring Harbor Laboratory Press）Chapter 9に記載の

方法に従ってニトロセルロース膜（ミリボア社製）上に固定した。その後、この膜を $2 \times \text{SSC}$ で 60°C で洗浄した。

2) 4. で得られた標識化DNAプローブ画分のうち $150\mu\text{l}$ を、該膜上に固定したブランクのcDNAプローブと以下の条件でハイブリダイズさせた。

①プレハイブリダイゼーション

$6 \times \text{SSC}$

$5 \times \text{Denhardt's}$

0.05% ピロリン酸ナトリウム

$100\mu\text{g/ml}$ denatured herring sperm

DNA

0.5% SDS

総液量 50ml

反応温度 37°C

反応時間 1 時間

②ハイブリダイゼーション

$6 \times \text{SSC}$

$1 \times \text{Denhardt's}$

0.05% ピロリン酸ナトリウム

$100\mu\text{g/ml}$ denatured herring sperm

DNA

$1 \times 10^6 \text{cpm/ml}$ cDNAプローブ

総液量 50ml

反応温度 42°C

反応時間 18 時間

3) ハイブリダイズの終了したニトロセルロース膜を以下の条件で 1 回ずつ洗浄した。

① $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 500 ml

温度 40°C

時間 20 分間

② $3 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 500 ml

時間 42°C

時間 20 分間

4) 洗浄したニトロセルロース膜はKODAK XAR 5フィルムに -80°C で一晩露光し、オートラジオグラフとした。

5) 得られたオートラジオグラフから、陽性のブランクの位置を決定し、対応する寒天上のブランクをSM溶液 (0.1 M NaCl 、 0.16 M MgSO_4 、 50 mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.5$)、 0.01% ゼラチン) に回収した。

6) 回収したブランクは、常法により再度NZY寒天培地上にブランク形成を行わせ、ニトロセルロース膜上に固定した。

7) 2) ~ 6) の過程を3回繰り返した。その結果、陽性のブランクは単一なものとなった。該ブランクを回収し、 $100 \mu\text{l}$ のSM溶液に懸濁し、ファージを安定化させた。該ブランクから単離した遺伝子をTIP 49 遺伝子と名付けた。

6. TIP 49 遺伝子の大量調製

1) SM溶液に懸濁したブランクのファージ $50 \mu\text{l}$ と Y1090 r-大腸菌 $20 \mu\text{l}$ を混合し、 37°C 、 15 分間 放置した。

2) その後、 $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含む 10 ml NZY 培地に 1) で混合した溶液を移し、 37°C で 6 時間 培養した。

3) 8000 rpm 、 5 分間 遠心分離し、上清を回収した。

4) 該上清に、 5 M NaCl を 1 ml 、ポリエチレングリコール 6000 を 1.1 g を加え、溶かした。

5) 該溶液を氷上に 1 時間 置き、その後 10000 rpm 、 4°C で 20 分間 遠

心分離を行った。

6) 沈殿を回収し、700 μ lのSM溶液に懸濁した。

7) クロロホルムを500 μ l加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

8) 5000 rpm、10分間遠心分離し、水層を回収した。

9) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I (共にシグマ製) を各1 μ lずつ加え、37°Cで1時間放置したのち、20%ポリエチレングリコール6000 (0.8M NaCl) を600 μ l加え、氷上に30分間放置した。

10) 4°Cで、15000 rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

11) この沈殿に500 μ lのSM溶液、50 μ lの5M NaCl、50 μ lの0.5M EDTAを加え、更に、400 μ lのフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

12) 該溶液を室温で15000 rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収した。これに1mlのエタノールを加え、15000 rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

13) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100 μ lのTE溶液 (Tris-Cl pH8.0 10mM、1mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

7. TIP49遺伝子のベクターへの挿入

1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素EcoRI (宝酒造製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (6. で調製したもの)	20 μ l
EcoRI (Takara社製)	2 μ l
RNase A (日本ジーン社製)	1 μ l
10×H buffer (宝酒造社製)	10 μ l
滅菌水	67 μ l

合計 100 μ l

反応温度 37 °C

反応時間 4 時間

2) その後、0.7% NuSieve GTG アガロース (登録商標、宝酒造社製) 電気泳動を行い、1.6 kbp 付近の DNA を切り出し、この DNA を GENE CLEAN II (登録商標、フナコシ社製) を用いて取扱説明書の通りに DNA を回収した。

3) DNA を組み込む pBluescript II (ストラタジーン社製) を EcoRI で切断後脱リン酸化を行った。

① EcoRI での切断は、以下の系で行った。

pBluescript II (1 μ g/ μ l)	3 μ l
10×H buffer	2 μ l
EcoRI	2 μ l
滅菌水	13 μ l
合計	20 μ l

反応温度 37 °C

反応時間 一晩

② その後、2 μ l 1M Tris pH8.0 を加え、1 μ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) を加え、65 °C で 1 時間放置し、脱リン酸化した。

③ その後、フェノール/CHCl₃ 抽出を常法に従い 2 回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製し、TE 溶液にて 100 μ g/ μ l に溶かした。

④ 2) で得られた DNA と、③ で得られた pBluescript II を、以下の系で反応させ、DNA をベクターに挿入した。

DNA (1.6 kbp、2) で調製したもの)	5 μ l
pBluescript II NotI 切断物 (③ で調製したもの)	1 μ l

10倍ライゲーションバッファー（日本ジーン社製）	2 μ l
T4リガーゼ（日本ジーン社製）	1 μ l
滅菌水	11 μ l
	合計 20 μ l

反応温度 16 °C

反応 2 時間

8. T I P 4 9 遺伝子の大腸菌への導入

常法に従い反応液を全て、E. coli JM109 コンピテントセル（宝酒造社製）に混合し、氷上で30分間、42 °Cで45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900 μ lを加え、37 °Cで1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

なお、このT I P 4 9 遺伝子を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成9年6月23日に寄託し（受託番号：FERM P-16282）、平成10年5月25日に国際寄託に移管した（受託番号：FERM BP-6377）。

9. T I P 4 9 遺伝子の塩基配列の決定

1) 8. で回収したE. coli JM109をLB寒天培地（100 μ g/mlアンピシリン、0.1 mM IPTG、0.004% X-gal含有）に撒き、37 °Cで16時間培養した。

2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを2 ml LB培地（100 μ g/mlアンピシリン）に植え、37 °Cで16時間培養した

3) その後、12000 rpm、1分間遠心分離して集菌し、Magic Miniprep（登録商標、プロメガ社製）に従いプラスミドDNA溶液を回収した。

4) 回収したDNAをダイターミネータFSシーケンスキット（パーキンエ

ルマー社製) 及びオートシーケンサーABI 3739を用いて、シーケンスし、全塩基配列を決定した。結果を配列表の配列番号2に示す。

10. TIP 49のアミノ酸配列の決定

9. で決定した塩基配列から、TIP 49のアミノ酸配列を決定した。結果を配列表の配列番号1に示す。

また、図2にTIP 49蛋白質のアミノ酸配列及びTIP 49遺伝子の塩基配列を示す。図2中、下線を付した部位が3. でペプチドシーケンスした配列①ないし④の部位である。

また、枠で囲った部位が、ATPase及びDNAヘリケース(helicase)に特徴的な配列の部位である。

さらに、TIP 49蛋白質は原核生物が発現するRuvB蛋白質と高いホモロジーを有することが分かった。RuvB蛋白質はDNAを組み換え及び修復する蛋白質である。図3にTIP 49蛋白質及び遺伝子とRuvB蛋白質及び遺伝子とのホモロジーを示す。図中のかっこ内の数字は蛋白質のホモロジーを示し、かっこのつかない数字は遺伝子のホモロジーを示す。動物細胞由来の蛋白質が原核生物の蛋白質と高いホモロジーを有する前例はほとんどない。

また、4. で用いた⑤ないし⑦のプロープが結合した部位は、それぞれ、⑤及び⑥が塩基配列の1372番～1395番、⑦が415番～434番の相補鎖の配列部位であると推測される。

<実施例2> TIP 49遺伝子のラット肝臓癌発癌状態での発現の確認

1. 各種ラット肝臓の調製

1) 5週齢のウィスター系ラット10匹を購入し、うち7匹にDNA障害性薬物であるDEN(ジエチルニトロソアミン)を0.2mg/gラットの濃度で腹腔内投与し、12, 24, 48時間後に各1匹ずつラットを殺し、肝臓を採取し、液体窒素中で保存した。

2) 残りのDEN投与ラットは、2週間後、AAF(アミノアセチルフルオレ

ン)を0.02%含むエサの継続的経口投与(1回/日)を開始した。DENを投与していないラット3匹について、再生肝手術を行い、12, 24, 48時間後に肝臓を採取し、液体窒素中で保存した。

2. RNAの調製

『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) pp 7.3-7.84に記載のチオシアン酸グアニジン法に従い、各種ラット肝臓のRNAを調製した。

実際には、各種ラット肝臓1gをそれぞれ液体窒素中で粉砕した後、50mlの5.5Mチオシアン酸グアニジン液に加えホモジナイズした後、プロトコール通りに超遠心分離を行い、さらに精製を行いRNA標品を得た。

また得られたRNA標品は、oligotex-dT3 super (登録商標、宝酒造社製)を用いて製品説明書の方法に従い、polyA RNAに精製した。

3. プローブDNAの調整

TIP49遺伝子を用いてハイブリダイゼーション用のプローブを作製した。作製方法は、pBluescript II上にのせたTIP49遺伝子を制限酵素処理にて、TIP49遺伝子部分を切り出し、アガロースゲル電気泳動にて目的遺伝子を分離後、GENE CLEAN II (登録商標、フナコシ社製)を用いてTIP49遺伝子を精製した。精製したTIP49遺伝子を100ng用いて、ランダムプライムドDNAラベリングキット(ベーリンガーマンハイム社製)を用いて製品取扱説明書に従い α -P³²dCTP(アマシャム社製)を用いてDNAプローブを作製し、次のノーザンブロットハイブリダイゼーションに用いた。

4. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

1) 『Molecular Cloning Second Edition』

(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) pp 7. 3-7. 84に記載のノーザンブロット法(ホルムアルデヒド法)に従いノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。DNAプローブとして3. で調整したものを用いた。

実際には、サンプル調製時のRNAはpolyA RNA 300ngを用いた。

また、オートラジオクラフィーの感光時間は48時間とした。

2) 1. ~4. 1) の操作により図4に示すTIP49遺伝子発現のパターンが得られた。

図4から、DEN投与したラットの肝臓のみが正常ラットの肝臓に比してドットが濃くなっている(mRNAの発現量が増加している)ことが判明した。DENはDNA障害を引き起こす物質であることからTIP49遺伝子はDNA障害時に増加する遺伝子であることが分かった。したがって、TIP49遺伝子を用いてDNA障害を検出すること可能であると考えられる。

<実施例3> TIP49遺伝子の組織間分布の確認

組織間分布の確認には、Rat MTN Blot (登録商標、クローンテック社製)を用いた。この製品は、上述のノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うために市販されている、ラット各組織のpolyA RNAをブロットしたメンブランである。このメンブランを実施例2と同様にしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。オートラジオクラフィーの感光時間は96時間とした。

その結果を図5に示す。結果から明らかなように、TIP49遺伝子は精巣(Testis)、骨格筋(Skeletal muscle)、心臓(Heart)及び腎臓(Kidney)で強く発現しているが、全組織で発現がみられる普遍的な遺伝子であることが判明した。

<実施例4> TIP49の大量調整

1. T I P 4 9 遺伝子の大量調整

1) 組み換えベクターの作製

T I P 4 9 遺伝子を図6に示されるヒスチジントグを導入したp E T 3 a - H i s ベクター（インビトロゲン社製）に組み込んだ。以下に、その詳細を記す。

①まず、実施例1の7. で作製したT I P 4 9 遺伝子を挿入したp B l u e s c r i p t I I ベクターを、PCR法（『Current protocols in molecular biology』（Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987）chapter 15に記載）により、次の配列⑧及び配列⑨の塩基配列のプライマーを用いて、該T I P 4 9 遺伝子部分を増幅した。

配列⑧CGAATTCATG AAGATTGAGG AGGTGAAGAG CACC

配列⑨CATACCCACC CATGGGGTTC TCTGTCTCAC

配列⑧の5' 端からの7塩基はE c o R I サイトである。

②増幅された遺伝子をN c o I, E c o R I で切断した。

③別に、実施例1の7. で作製したp B l u e s c r i p t I I 上のT I P 4 9 遺伝子のC末端側に存在する部分をE c o R I で切断し、遺伝子を切り出した。

④②で切り出した遺伝子と③で切り出した遺伝子とを、L i g a t i o n P a c k （日本ジーン社製）を用いてその取扱説明書に従い連結し、T I P 4 9 遺伝子を作製した。

⑤ヒスチジントグを導入したp E T 3 a - H i s ベクターのE c o R I 部位に、④で作製したT I P 4 9 遺伝子を組み込んだ（図6）。

2) T I P 4 9 遺伝子の大量調整

T I P 4 9 遺伝子を組み込んだプラスミドを『Molecular Cloning Second Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）chapter 1に記載の方法で大量調製した。プラスミドはJ M 1 0 9 コンピテントセル（宝酒造社製）

に取扱説明書に従って導入し、800mlのアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、回収したJM109よりアルカリ法(『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989) 1.33-1.43に記載)によりプラスミドを回収した。なお、プラスミドの精製には同書記載の超遠心分離を用いたが、その回数は3回行った。

2. TIP 49の発現

(1) 大量調製したプラスミドを大腸菌BL21(DE3) pLysSに導入した。

(2) 該大腸菌をアンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地で培養し、分光光度計(ベックマン製)で濁度が600nmの波長で0.5になった時点でIPTGを0.5mMになるように加え、TIP 49の発現誘導を行った。対照として、IPTCを添加しない場合も行った。

3. TIP 49の精製

(1) 2時間後、大腸菌を回収し、Lysis Bufferに懸濁した後4 $^{\circ}$ Cでソニケーションし、Beckman Optima XL-80を使用し、50.2Tiローターで1800rpm、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。

(2) その後、上清を取り、1Mイミダゾール(pH7.5)を終濃度10mMになるように加え、Ni-NTAアガロースカラム(キアゲン製)を用いて非変性条件で取扱い説明書の通りに精製した。

これとは別に、イオン交換カラムMonoQ(登録商標、ファーマーゲン社製)を用いた液体クロマトグラフィー{ベースの緩衝液(20mM Tris-HCl(pH7.9)、10%グリセロール、5mM 2-ME、0.5mM PMSF)、溶出液(KCl 0.04-0.4Mのグラジェント)}にて、製品説明書記載の方法に準じてTIP 49の精製を行った。

(3) 精製された標品を、10%SDS-PAGE電気泳動にかけ、クマシー

ブリリアントブルーで染色した。

Ni-NTAアガロースカラムによる精製の結果を図7に示す。図7中、lysate (-) はIPTCを添加しなかった細胞溶解液を電気泳動したものであり、lysate (+) はIPTCを添加した細胞溶解液を電気泳動したものである。Ni-NTAアガロースカラム、Mono Qのいずれにも49 kDの位置にTIP 49のバンドが確認された。

また、Mono Qのカラムパターンと精製蛋白質の電気泳動（クマシー染色）の結果を図8 A及び図8 Bに示す。図8 Aに溶出パターンを、図8 Bに精製蛋白質の電気泳動の結果を示す。KCl濃度が約0.2 M（第43画分）でTIP 49が溶出されることが分かった。

<実施例5>抗TIP 49抗体の作製

(1) 抗体の作製は、実施例4で得た精製TIP 49 1mgを用いて、『Antibodies A Laboratory Manual』（Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）chapter 5に記載の方法に従い、ウサギに免疫し、抗血清を回収した。

(2) ラット肝細胞核抽出液、該核抽出液から精製したTIP 49及び実施例4でNi-NTAアガロースカラムで精製した組み換えTIP 49について、それぞれ抗TIP 49抗体を用いてウェスタンブロット法による解析を行った。結果を図9に示す。図9中、Nuclear extractは核抽出液のレーンであり、TIPsは核抽出液を精製したTIP 49のバンドである。コントロールはTIP 49を溶出した後のNi-NTAアガロースカラムのビーズのバンドである。49 kDの位置にTIP 49のバンドが確認された。rTIP 49は組み換えTIP 49のバンドであり、ヒスチジンタグの分だけ分子量が大きくなっている。この結果、抗原抗体反応の確認及び核抽出液から精製したTIP 49と遺伝子工学的に発現させたTIP 49が同じものであることの確認がなされた。

<実施例6>TIP 49がTBPと複合体を形成することの確認

HAタグ付のTBPを動物細胞内で発現させ、TIP49がTBPと複合体を形成することの確認試験を行った。

1. 核抽出液の作製

1) マウス細胞株FM3A (理研ジーンバンクRCB0086) にレトロウィルスベクターを用いてHA-TBP遺伝子を導入し、組み換えFM3A細胞を作製した。

2) 組み換えFM3A細胞をES培地 (ニッスイ社製) にFCSを10%になるように加えた培地1lで 7×10^5 個/mlになるように調製した。

3) 『バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法』pp27~37 (1993年、羊土社) に記載の方法にしたがって培養したFM3Aから核抽出液を4ml (3.5mg/ml) 調製した。具体的には、FM3A 1リットルの培養液を遠心し細胞を回収した後、前記『バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法』pp27~37 (1993年、羊土社) に記載の条件に準じて行った。

2. TIP49-TBP複合体形成の確認

1) 抗HA抗体 (バブコ社製) をプロテインAセファロースビーズ (ファルマシア社製) に結合させ、抗HA抗体-ビーズを作製した。

2) 1. で作製した核抽出液と抗HA抗体-ビーズを混合し、『Antibodies A Laboratory Manual』chapter11に記載の方法にしたがって免疫沈降を行った。

3) 2) で沈降したビーズをIP緩衝液 (1mg/ml HAペプチドを含む) で溶出した。

4) FM3A核抽出液 (N. E)、2) で免疫沈降したビーズを遠心分離した上清 (IP sup.) 及び3) で作製した溶出液 (Elute) について、それぞれ抗TBP抗体、抗HA抗体、抗TIP49抗体を用いて、『Current protocols in molecular biology』(Greene Publishing Associates and Wiley

-Interscience, 1987) chapter 1に記載の方法に準じてウェスタンブロット法による解析を行った。

なお、ウェスタンブロット法による解析は、具体的には以下のウェスタンブロッティングにより行なった。すなわち、トランスファーバッファー (125mM Tris-base, 960mM glycine, 20% methanol) に浸したSDS-PAGE後のゲルと、メタノールに浸した後トランスファーバッファーに浸したPVD F膜 (ミリボア社製、Immobilon) をトランスファーバッファーに浸した3MM濾紙 (ワットマン社製) ではさみ、平板型転写装置 (日本エイドー社製) を用いて170mAで60分間蛋白質の膜への転写を行った。転写後の膜を3%スキムミルク (雪印社製) /TBST (20mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween20) でブロッキングした。一次抗体には、抗TBP抗体、抗HA抗体、抗TIP49抗体を、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体 (プロメガ社製) を用いた。発色反応は、ProtoBlot Western Blot AP System (プロメガ社製) を用いた。

各抗体をアルカリフォスファターゼで標識した二次抗体と反応させ、アルカリフォスファターゼを基質 (NBT、BCID (共にプロメガ社製)) と反応させて、ゲル上に各バンドを呈色させた。

抗TBP抗体は、『Antibodies A Laboratory Manual』chapter 5に記載の方法にしたがってウサギに免疫して作製した。

結果を図10に示す。図10中、N. E. (1レーン及び4レーン) はFM3A核抽出液のレーン、IP sup. (2レーン及び5レーン) は免疫沈降したときの上清、Elute (3レーン及び6レーン) は免疫沈降物の溶出液を表す。図10中の上段 (a) は一次抗体に抗TBP抗体を用いた結果を表し、中段 (b) は一次抗体に抗HA抗体を用いた結果を表し、下段 (c) は一次抗体に抗TIP49抗体を用いた結果を表す。図10中の右端のレーン (6レーン) にTBP及

びTIP49のレーンが見られ、TIP49とTBPが複合体を形成して、抗H A抗体-ビーズにより免疫沈降されたことが確認された。

<実施例7> TIP49のATPase活性の確認1

1) Mono Qで精製した第38画分から第47画分の各画分の溶出液と、 γ 位のリン(P)を ^{32}P として標識したATP ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP) とを、以下の組成の反応液で37°Cで60分間反応させた。

20mM Tris/HCl

70mM KCl

2.5mM MgCl_2

1.5mM ジチオスレイトール (DTT)

0.1mM ATP

$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP 0.125 μl

SP (滅菌蒸留水) で20 μl に調製

また、別に、M13 ssDNAを添加して上記反応をさせることも行った。

2) 反応液に、0.1N HClを100 μl 、2mg/ml BSAを100 μl 、10% (W/V) 活性炭を250 μl 加え、攪拌し、15分間氷上に静置した。

3) その後、4°Cにおいて15000 rpmで15分間遠心分離し、上清200 μl を新しいチューブに取り分けた。

4) この上清を4°Cにおいて15000 rpmで5分間遠心分離し、上清100 μl を新しいPCRチューブ (パーキンエルマー社製) に取り分けた。

5) この上清の放射線濃度を、液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) にて、製品の説明書にしたがって測定した。

結果を図11に示す。TIP49によりATPの γ 位の ^{32}P が切断され遊離し、その放射線が測定されることが分かる。図11中白抜きのグラフがM13 ssDNAを添加しなかった場合であり、遊離する ^{32}P が、反応液中のTIP49の量

に依存することが分かった。また、M13 ssDNAの添加により、TIP49のATPase活性が高くなることが分かった。

<実施例8> TIP49のATP活性の確認2

MonoQにより精製されたTIP49（第43画分）とATPとを実施例7と同様にして反応させ、添加する核酸を、M13 ssDNA、pBluescript、ラット肝癌細胞由来の全RNA（Total RNA0、PolyA、PolyG、PolyU、PolyC、無添加として、液体シンチレーションカウンタにより、TIP49のATPase活性を調べた。

結果を図12に示す。図12から、TIP49のATPase活性は核酸の添加によりいくらか活性化され、M13 ssDNAで特によく活性化されることが分かった。

<実施例9> TIP49のDNAのヘリケース (helicase) 活性の確認

1) MonoQで精製した第38画分から第47画分の溶出液と、 ^{32}P で標識した30bの一本差DNA (CAGTCACGAC GTTGTAAAC GACGGCCAGT) をM13 ssDNAとハイブリダイズさせたサンプルDNAを、ATPを添加して以下の組成の反応液で37°Cにおいて30分間反応させた。対照として、ATPを添加しない場合、ADPを添加した場合、 MgCl_2 を添加しない場合についても同様にMonoQで精製した溶出液とサンプルDNAとを反応させた。

20mM Tris-HCl pH7.5

2mM DTT

50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA

0.5mM MgCl_2

80mM KCl

1mM ATP

10-15ng (1500cpm) 基質 (M13 ssDNA)

酵素 (Mono Q精製溶出液)

SPで20 μ lに調製

2) 5 μ lの下記組成の停止液を加え、反応を停止させた。

60 mM EDTA

0.75% SDS

0.1% BPB

50%グリセロール

3) 反応液を10%アクリルアミド/0.5 \times TBE (Tris-borate/EDTA) 上で120Vの電圧をかけて電気泳動した。

4) 電気泳動終了後、ゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィー (感光時間12時間) を行った。

結果を図13に示す。図13からTIP49が多く含まれる画分 (第42ないし第45画分) では、サンプルDNAから解離された30bの一本鎖DNAのバンドが検出されることから、該画分のTIP49がM13と30bの一本鎖DNAの会合を解離することすなわちDNAヘリケース活性を有することが分かった。

また、ATPを添加しない場合、Mg²⁺を添加しない場合は、TIP49のDNAヘリケース活性がないことが分かった。

<実施例10> ヒトTIP49遺伝子の取得

1. ヒトcDNAライブラリーの作製

ヒト肝臓cDNAライブラリー (クローンテック社製) を用いて、10⁶程度のプラークをNZY寒天培地上に作製した。このcDNAライブラリーを『Molecular Cloning Second Edition』 (1989年、Cold Spring Harbor Laboratory Press) Chapter 9に記載の方法に従ってニトロセルロース膜 (ミリボア社製) 上に固定した。その後、この膜を2 \times SSCで60 $^{\circ}$ Cで洗浄した。

2. ヒトTIP49遺伝子の取得

プローブとしてTIP49 DNA (全長) を用いて、実施例1の5. と同様にヒトcDNAライブラリーから全長のヒトTIP49 遺伝子を得た。

3. ヒトTIP49 遺伝子の $E. coli$ への導入

実施例1の8. と同様にして上記で得たヒトTIP49 遺伝子を $E. coli$ JM109に導入した。その後、 $E. coli$ JM109を回収した。

なお、このTIP49 遺伝子を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に平成9年6月23日に寄託し (受託番号: FERM P-16281)、平成10年5月25日に国際寄託に移管した (受託番号: FERM BP-6376)。

4. ヒトTIP49 遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の9. と同様にしてダイターミネーターFSシーケンスキット (パーキンエルマー社製) 及びオートシーケンサーABI 3739を用いてヒトTIP49 遺伝子の全塩基配列を決定した。結果を配列表の配列番号4に示す。

5. ヒトTIP49のアミノ酸配列の決定

4. で決定した塩基配列から、ヒトTIP49のアミノ酸配列を決定した。結果を配列表の配列番号3に示す。

ラットTIP49 遺伝子とヒトTIP49 遺伝子のホモロジーは、蛋白質のコード領域において90.3%であり、ラットTIP49 蛋白質とヒトTIP49 蛋白質は291位のアミノ酸のみが異なり、種間で大変よく保存された蛋白質である。このことは、TIP49が生物にとって必須の物質であることを示唆する。

産業上の利用可能性

本発明のTIP49 蛋白質、TIP49 蛋白質の変異体、それらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド、前記蛋白質を認識する抗体により、生物の全遺伝子の転写に関わっているTBPの転

写制御機能の究明の一手段が供せられる。

また、本発明のTIP49は、DNAヘリケース、ATPaseとして使用可能である。

また、本発明のTIP49遺伝子は、DNA障害の検出に使用可能である。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：4 5 6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met	Lys	Ile	Glu	Glu	Val	Lys	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Gln	Arg	Ile	Ala
1				5					10					15	
Ser	His	Ser	His	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Ala
				20				25					30		
Lys	Gln	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Val	Gly	Gln	Glu	Asn	Ala	Arg	Glu	Ala
				35				40					45		
Cys	Gly	Val	Ile	Val	Glu	Leu	Ile	Lys	Ser	Lys	Lys	Met	Ala	Gly	Arg
				50				55				60			
Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	Ala
				65				70				75		80	
Leu	Ala	Ile	Ala	Gln	Glu	Leu	Gly	Ser	Lys	Val	Pro	Phe	Cys	Pro	Met
				85				90				95			
Val	Gly	Ser	Glu	Val	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Glu	Val	Leu
				100				105				110			
Met	Glu	Asn	Phe	Arg	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	Arg	Ile	Lys	Glu	Thr	Lys
				115				120				125			
Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Val	Thr	Glu	Leu	Thr	Pro	Cys	Glu	Thr	Glu
				130				135				140			

Asn Pro Met Gly Gly Tyr Gly Lys Thr Ile Ser His Val Ile Ile Gly
145 150 155 160
Leu Lys Thr Ala Lys Gly Thr Lys Gln Leu Lys Leu Asp Pro Ser Ile
165 170 175
Phe Glu Ser Leu Gln Lys Glu Arg Val Glu Ala Gly Asp Val Ile Tyr
180 185 190
Ile Glu Ala Asn Ser Gly Ala Val Lys Arg Gln Gly Arg Cys Asp Thr
195 200 205
Tyr Ala Thr Glu Phe Asp Leu Glu Ala Glu Glu Tyr Val Pro Leu Pro
210 215 220
Lys Gly Asp Val His Lys Lys Lys Glu Ile Ile Gln Asp Val Thr Leu
225 230 235 240
His Asp Leu Asp Val Ala Asn Ala Arg Pro Gln Gly Gly Gln Asp Ile
245 250 255
Leu Ser Met Met Gly Gln Leu Met Lys Pro Lys Lys Thr Glu Ile Thr
260 265 270
Asp Lys Leu Arg Gly Glu Ile Asn Lys Val Val Asn Lys Tyr Ile Asp
275 280 285
Gln Gly Val Ala Glu Leu Val Pro Gly Val Leu Phe Val Asp Glu Val
290 295 300
His Met Leu Asp Ile Glu Cys Phe Thr Tyr Leu His Arg Ala Leu Glu
305 310 315 320
Ser Ser Ile Ala Pro Ile Val Ile Phe Ala Ser Asn Arg Gly Asn Cys
325 330 335
Val Ile Arg Gly Thr Glu Asp Ile Thr Ser Pro His Gly Ile Pro Leu
340 345 350

Asp Leu Leu Asp Arg Val Met Ile Ile Arg Thr Met Leu Tyr Thr Pro
 355 360 365
 Gln Glu Met Lys Gln Ile Ile Lys Ile Arg Ala Gln Thr Glu Gly Ile
 370 375 380
 Asn Ile Ser Glu Glu Ala Leu Asn His Leu Gly Glu Ile Gly Thr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Leu Arg Tyr Ser Val Gln Leu Leu Thr Pro Ala Asn Leu Leu
 405 410 415
 Ala Lys Ile Asn Gly Lys Asp Ser Ile Glu Lys Glu His Val Glu Glu
 420 425 430
 Ile Ser Glu Leu Phe Tyr Asp Ala Lys Ser Ser Ala Lys Ile Leu Ala
 435 440 445
 Asp Gln Gln Asp Lys Tyr Met Lys
 450 455

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 5 8 7

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

CGCAGGTTGT GGCTGCACAC ACTCGTCAAA ATG AAG ATT GAG GAG GTG AAG AGC ACC 57
 ACG AAG ACG CAA CGC ATT GCC TCC CAC AGC CAC GTG AAG GGG CTG GGG 105
 CTG GAT GAG AGC GGC CTG GCC AAG CAG GCG GCT TCG GGG CTC GTG GGC 153
 CAG GAG AAC GCG AGA GAG GCA TGT GGT GTC ATA GTC GAA TTA ATC AAA 201
 AGC AAG AAA ATG GCT GGA AGA GCT GTC TTG TTG GCA GGG CCT CCT GGA 249

ACT GGC AAG ACA GCC TTG GCC CTG GCT ATT GCT CAG GAA CTG GGC AGT	297
AAA GTC CCT TTC TGC CCG ATG GTG GGT AGT GAA GTA TAC TCA ACT GAG	345
ATC AAG AAG ACA GAG GTG CTG ATG GAG AAC TTC CGA AGG GCT ATT GGG	393
CTG CGG ATA AAG GAG ACT AAG GAG GTT TAT GAA GGG GAG GTG ACA GAG	441
CTC ACT CCC TGT GAG ACA GAG AAC CCC ATG GGT GGG TAT GGC AAA ACT	489
ATC AGC CAC GTG ATC ATA GGG CTC AAG ACT GCC AAA GGA ACC AAA CAG	537
CTG AAG CTG GAC CCC AGT ATT TTT GAA AGT TTG CAG AAA GAA CGA GTA	585
GAG GCT GGA GAT GTG ATT TAC ATT GAA GCA AAC AGT GGA GCT GTG AAG	633
AGG CAA GGC AGG TGT GAC ACC TAT GCC ACA GAG TTT GAC CTT GAG GCT	681
GAA GAG TAT GTC CCT TTG CCA AAG GGA GAT GTG CAC AAG AAG AAG GAA	729
ATC ATA CAG GAT GTG ACC TTG CAC GAC TTG GAC GTG GCC AAT GCG CGG	777
CCT CAG GGT GGG CAA GAT ATT CTG TCT ATG ATG GGC CAG TTG ATG AAG	825
CCA AAA AAG ACA GAG ATC ACA GAT AAA CTT CGA GGG GAG ATC AAC AAG	873
GTG GTG AAC AAA TAC ATT GAC CAG GGC GTT GCA GAG CTG GTC CCT GGA	921
GTG CTC TTT GTT GAC GAG GTC CAC ATG CTG GAT ATC GAG TGC TTT ACC	969
TAC CTG CAC CGA GCC CTG GAG TCC TCC ATC GCC CCC ATT GTC ATC TTT	1017
GCA TCC AAC CGA GGC AAC TGT GTC ATC AGG GGC ACC GAG GAC ATC ACT	1065
TCT CCA CAC GGC ATC CCG TTG GAC CTG CTG GAC CGG GTG ATG ATC ATC	1113
AGG ACC ATG CTG TAT ACG CCA CAG GAG ATG AAG CAG ATC ATT AAG ATC	1161
CGA GCC CAG ACG GAA GGC ATC AAC ATC AGT GAG GAG GCC CTA AAC CAC	1209
CTC GGG GAG ATT GGC ACC AAG ACC ACG CTG AGG TAT TCA GTG CAG CTG	1257
CTG ACC CCT GCC AAC CTG CTG GCC AAG ATC AAC GGG AAG GAC AGC ATT	1305
GAG AAG GAG CAC GTG GAG GAG ATC AGC GAG CTC TTC TAT GAC GCC AAG	1353
TCC TCC GCC AAG ATT CTG GCC GAC CAG CAG GAC AAG TAC ATG AAG TAA	1401
CGTAGGGTTT GGAGGTGCAC CCAGAGGACA GACCCACAC CGAGGACAGG GTCTTGCGTT	1461
GAGCATGCTT TGCAGTGTTA CAGTTTGTTC GTAAATTATC AAACCTCCAA GGTGTTTGG	1521

AAGGAACCCT TTCCACCTA GCTTGT TTTT CTAATAAAAC TGAATCTTAT TTTGATGATA 1581
 AAAAAA 1587

配列番号 : 3

配列の長さ : 4 5 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

配列

Met Lys Ile Glu Glu Val Lys Ser Thr Thr Lys Thr Gln Arg Ile Ala

1 5 10 15

Ser His Ser His Val Lys Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ser Gly Leu Ala

20 25 30

Lys Gln Ala Ala Ser Gly Leu Val Gly Gln Glu Asn Ala Arg Glu Ala

35 40 45

Cys Gly Val Ile Val Glu Leu Ile Lys Ser Lys Lys Met Ala Gly Arg

50 55 60

Ala Val Leu Leu Ala Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Ala Leu Ala

65 70 75 80

Leu Ala Ile Ala Gln Glu Leu Gly Ser Lys Val Pro Phe Cys Pro Met

85 90 95

Val Gly Ser Glu Val Tyr Ser Thr Glu Ile Lys Lys Thr Glu Val Leu

100 105 110

Met Glu Asn Phe Arg Arg Ala Ile Gly Leu Arg Ile Lys Glu Thr Lys

115 120 125

Glu Val Tyr Glu Gly Glu Val Thr Glu Leu Thr Pro Cys Glu Thr Glu

130 135 140
Asn Pro Met Gly Gly Tyr Gly Lys Thr Ile Ser His Val Ile Ile Gly
145 150 155 160
Leu Lys Thr Ala Lys Gly Thr Lys Gln Leu Lys Leu Asp Pro Ser Ile
165 170 175
Phe Glu Ser Leu Gln Lys Glu Arg Val Glu Ala Gly Asp Val Ile Tyr
180 185 190
Ile Glu Ala Asn Ser Gly Ala Val Lys Arg Gln Gly Arg Cys Asp Thr
195 200 205
Tyr Ala Thr Glu Phe Asp Leu Glu Ala Glu Glu Tyr Val Pro Leu Pro
210 215 220
Lys Gly Asp Val His Lys Lys Lys Glu Ile Ile Gln Asp Val Thr Leu
225 230 235 240
His Asp Leu Asp Val Ala Asn Ala Arg Pro Gln Gly Gly Gln Asp Ile
245 250 255
Leu Ser Met Met Gly Gln Leu Met Lys Pro Lys Lys Thr Glu Ile Thr
260 265 270
Asp Lys Leu Arg Gly Glu Ile Asn Lys Val Val Asn Lys Tyr Ile Asp
275 280 285
Gln Gly Ile Ala Glu Leu Val Pro Gly Val Leu Phe Val Asp Glu Val
290 295 300
His Met Leu Asp Ile Glu Cys Phe Thr Tyr Leu His Arg Ala Leu Glu
305 310 315 320
Ser Ser Ile Ala Pro Ile Val Ile Phe Ala Ser Asn Arg Gly Asn Cys
325 330 335
Val Ile Arg Gly Thr Glu Asp Ile Thr Ser Pro His Gly Ile Pro Leu

340 345 350
 Asp Leu Leu Asp Arg Val Met Ile Ile Arg Thr Met Leu Tyr Thr Pro
 355 360 365
 Gln Glu Met Lys Gln Ile Ile Lys Ile Arg Ala Gln Thr Glu Gly Ile
 370 375 380
 Asn Ile Ser Glu Glu Ala Leu Asn His Leu Gly Glu Ile Gly Thr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Leu Arg Tyr Ser Val Gln Leu Leu Thr Pro Ala Asn Leu Leu
 405 410 415
 Ala Lys Ile Asn Gly Lys Asp Ser Ile Glu Lys Glu His Val Glu Glu
 420 425 430
 Ile Ser Glu Leu Phe Tyr Asp Ala Lys Ser Ser Ala Lys Ile Leu Ala
 435 440 445
 Asp Gln Gln Asp Lys Tyr Met Lys
 450 455

配列番号：4

配列の長さ：1730

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

CGGCGCACTG TCCTAGCTGC TGGTTTTCCA CGCTGGTTTT AGCTCCCGGC GTCTGCAAA 59
 ATG AAG ATT GAG GAG GTG AAG AGC ACT ACG AAG ACG CAG CGC ATC GCC 107
 TCC CAC AGC CAC GTG AAA GGG CTG GGG CTG GAC GAG AGC GGC TTG GCC 155
 AAG CAG GCG GCC TCA GGG CTT GTG GGC CAG GAG AAC GCG CGA GAG GCA 203

TGT GGC GTC ATA GTA GAA TTA ATC AAA AGC AAG AAA ATG GCT GGA AGA	251
GCT GTC TTG TTG GCA GGA CCT CCT GGA ACT GGC AAG ACA GCT CTG GCT	299
CTG GCT ATT GCT CAG GAG CTG GGT AGT AAG GTC CCC TTC TGC CCA ATG	347
GTG GGG AGT GAA GTT TAC TCA ACT GAG ATC AAG AAG ACA GAG GTG CTG	395
ATG GAG AAC TTC CGC AGG GCC ATT GGG CTG CGA ATA AAG GAG ACC AAG	443
GAA GTT TAT GAA GGT GAA GTC ACA GAG CTA ACT CCG TGT GAG ACA GAG	491
AAT CCC ATG GGA GGA TAT GGC AAA ACC ATT AGC CAT GTG ATC ATA GGA	539
CTC AAA ACA GCC AAA GGA ACC AAA CAG TTG AAA CTG GAC CCC AGC ATT	587
TTT GAA AGT TTG CAG AAA GAG CGA GTA GAA GCT GGA GAT GTG ATT TAC	635
ATT GAA GCC AAC AGT GGG GCC GTG AAG AGG CAG GGC AGG TGT GAT ACC	683
TAT GCC ACA GAA TTC GAC CTT GAA GCT GAA GAG TAT GTC CCC TTG CCA	731
AAA GGG GAT GTG CAC AAA AAG AAA GAA ATC ATC CAA GAT GTG ACC TTG	779
CAT GAC TTG GAT GTG GCT AAT GCG CGG CCC CAG GGG GGA CAA GAT ATC	827
CTG TCC ATG ATG GGC CAG CTA ATG AAG CCA AAG AAG ACA GAA ATC ACA	875
GAC AAA CTT CGA GGG GAG ATT AAT AAG GTG GTG AAC AAG TAC ATC GAC	923
CAG GGC ATT GCT GAG CTG GTC CCG GGT GTG CTG TTT GTT GAT GAG GTC	971
CAC ATG CTG GAC ATT GAG TGC TTC ACC TAC CTG CAC CGC GCC CTG GAG	1019
TCT TCT ATC GCT CCC ATC GTC ATC TTT GCA TCC AAC CGA GGC AAC TGT	1067
GTC ATC AGA GGC ACT GAG GAC ATC ACA TCC CCT CAC GGC ATC CCT CTT	1115
GAC CTT CTG GAC CGA GTG ATG ATA ATC CGG ACC ATG CTG TAT ACT CCA	1163
CAG GAA ATG AAA CAG ATC ATT AAA ATC CGT GCC CAG ACG GAA GGA ATC	1211
AAC ATC AGT GAG GAG GCA CTG AAC CAC CTG GGG GAG ATT GGC ACC AAG	1259
ACC ACA CTG AGG TAC TCA GTG CAG CTG CTG ACC CCG GCC AAC TTG CTT	1307
GCT AAA ATC AAC GGG AAG GAC AGC ATT GAG AAA GAG CAT GTC GAA GAG	1355
ATC AGT GAA CTT TTC TAT GAT GCC AAG TCC TCC GCC AAA ATC CTG GCT	1403
GAC CAG CAG GAT AAG TAC ATG AAG TGA GATGGCTGAG GTTTTCAGCA	1450

GTAAGAGACT CCCAGGTGT GCCTGGCCTG GGTCCAGCCT GTGGGCGCTT GCCCCTGGGC 1510
TTGGGGCTGC CGTCCCCACT CAGGCGTGGT CTGCAGCGCT GTCAGTTCAG TGTGGAAAGC 1570
ATTTCTTTTT AAGTTATCGT AACTGTTTCCT GTGGTTGCTT TGAAAGAACC CTCCTTACC 1630
TGGTGTGTTT TCTATAAATC TTCATAGGTT ATTTTGATTC TCTCTCTCTC TCTCTCTAAG 1690
TTTTTTAAAA ATAACTTTT CAGAACAAAA AAAAAACCG 1730

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 及び (b) からなる群から選択される蛋白質、
 - (a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、
 - (b) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。
2. 以下の (c) 及び (d) からなる群から選択される蛋白質、
 - (c) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、
 - (d) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。
3. さらに、ATPase 活性を有する請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質。
4. さらに、DNA ヘリケース活性を有する請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の蛋白質。
5. 以下の (e) 及び (f) からなる群から選択される蛋白質、
 - (e) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の一部からなる蛋白質、
 - (f) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の一部において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。
6. 以下の (g) 及び (h) からなる群から選択される蛋白質、
 - (g) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の一部からなる蛋白質、
 - (h) TBP との複合体を形成する能力を有し、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の一部において一又は複数のアミノ酸が置換、欠失又は付加さ

れたアミノ酸配列からなる蛋白質。

7. さらに、ATPase活性を有する請求項5又は6に記載の蛋白質。

8. さらに、DNAヘリケース活性を有する請求項5ないし7のいずれか一項に記載の蛋白質。

9. 請求項1ないし8のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするDNA。

10. 配列表の配列番号2又は配列番号4に記載の塩基配列からなるDNA。

11. 請求項9又は10に記載のDNAがコードするRNA。

12. 請求項9又は10に記載のDNAのアンチセンスDNA或いは請求項11に記載のRNAのアンチセンスRNA、又はそれらの誘導体からなるアンチセンスポリヌクレオチド。

13. 請求項9ないし12のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する12塩基以上からなるポリヌクレオチド。

14. 化学修飾された請求項9ないし13のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

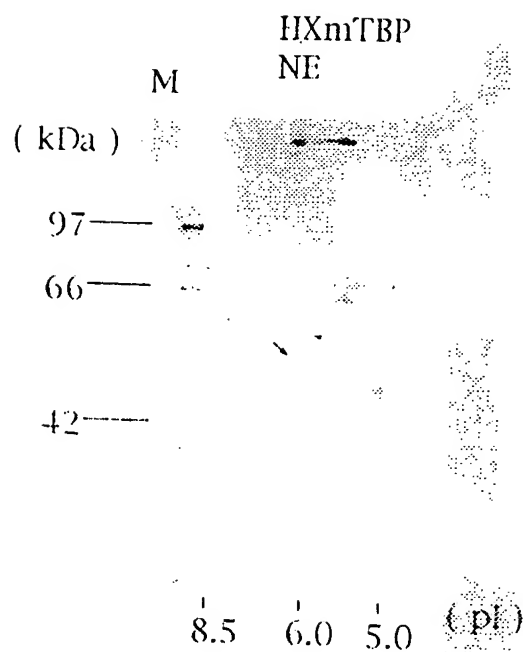
15. 請求項10に記載のDNAのホモログであるcDNAを取得する方法であって、請求項12又は13に記載のポリヌクレオチドをプローブとして、cDNAライブラリーから該ポリヌクレオチドとハイブリダイズするcDNAを取得する方法。

16. 請求項10に記載のDNAのホモログであって、請求項15に記載の取得方法によって取得されたcDNA。

17. 配列表の配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質のホモログであって、請求項16に記載のcDNAがコードするアミノ酸配列からなる蛋白質。

18. 請求項1ないし8又は17のいずれか一項に記載の蛋白質を認識する抗体。

1



2

CGCAGGTTGT GGCTGCACAC ACTCGTCAAA ATG AAG ATT GAG GAG GTG AAG AGC ACC ACG AAG ACG 66
M K I E E V K S T T K T 12

CAA CGC ATT GCC TCC CAC AGC CAC GTG AAG GGG CTG GGG CTG GAT GAG AGC GGC CTG GCC 126
Q R I A S H S H V K G L G L D E S G L A 32

AAG CAG GCG GCT TCG GGG CTC GTG GGC CAG GAG AAC GCG AGA GAG GCA TGT GGT GTC ATA 186
K Q A A S G L V G Q E N A R E A C G V I 52

GTC GAA TTA ATC AAA AGC AAG AAA ATG GCT GGA AGA GCT GTC TTG TTG GCA GGG CCT CCT 246
V E L I K S K K M A G R A V L L A G P P 72

GGA ACT GGC AAG ACA GCC TTG GCC CTG GCT ATT GCT CAG GAA CTG GGC AGT AAA GTC CCT 306
G T G K T A L A L A I A Q E L G S K V P 92

TTC TGC CCG ATG GTG GGT AGT GAA GTA TAC TCA ACT GAG ATC AAG AAG ACA GAG GTG CTG 366
F C P M V G S E V Y S T E I K K T E V L 112

ATG GAG AAC TTC CGA AGG GCT ATT GGG CTG CGG ATA AAG GAG ACT AAG GAG GTT TAT GAA 426
M E N F R R A I G L R I K E T K E V Y E 132

GGG GAG GTG ACA GAG CTC ACT CCC TGT GAG ACA GAG AAC CCC ATG GGT GGG TAT GGC AAA 486
G E V T E L T P C E T E N P M G G Y G K 152

ACT ATC AGC CAC GTG ATC ATA GGG CTC AAG ACT GCC AAA GGA ACC AAA CAG CTG AAG CTG 546
T I S H V I I G L K T A K G T K Q L K L 172

GAC CCC AGT ATT TTT GAA AGT TTG CAG AAA GAA CGA GTA GAG GCT GGA GAT GTG ATT TAC 606
D P S I F E S L Q K E R V E A G D V I Y 192

ATT GAA GCA AAC AGT GGA GCT GTG AAG AGG CAA GGC AGG TGT GAC ACC TAT GCC ACA GAG 666
I E A N S G A V K R Q G R C D T Y A T E 212

TTT GAC CTT GAG GCT GAA GAG TAT GTC CCT TTG CCA AAG GGA GAT GTG CAC AAG AAG AAG 726
F D L E A E E Y V P L P K G D V H K K K 232

GAA ATC ATA CAG GAT GTG ACC TTG CAC GAC TTG GAC GTG GCC AAT GCG CGG CCT CAG GGT 786
E I I Q D V T L H D L D V A N A R P Q G 252

GGG CAA GAT ATT CTG TCT ATG ATG GGC CAG TTG ATG AAG CCA AAA AAG ACA GAG ATC ACA 846
G Q D I L S M M G Q L M K P K K T E I T 272

GAT AAA CTT CGA GGG GAG ATC AAC AAG GTG GTG AAC AAA TAC ATT GAC CAG GGC GTT GCA 906
D K L R G E I N K V V N K Y I D Q G V A 292

GAG CTG GTC CCT GGA GTG CTC TTT GTT GAC GAG GTC CAC ATG CTG GAT ATC GAG TGC TTT 966
E L V P G V L F V D E V H M L D I E C F 312

ACC TAC CTG CAC CGA GCC CTG GAG TCC TCC ATC GCC CCC ATT GTC ATC TTT GCA TCC AAC 1026
T Y L H R A L E S S I A P I V I F A S N 332

CGA GGC AAC TGT GTC ATC AGG GGC ACC GAG GAC ATC ACT TCT CCA CAC GGC ATC CCG TTG 1086
R G N C V I R G T E D I T S P H G I P L 352

GAC CTG CTG GAC CGG GTG ATG ATC ATC AGG ACC ATG CTG TAT ACG CCA CAG GAG ATG AAG 1146
D L L D R V M I I R T M L Y T P Q E M K 372

CAG ATC ATT AAG ATC CGA GCC CAG ACG GAA GGC ATC AAC ATC AGT GAG GAG GCC CTA AAC 1206
Q I I K I R A Q T E G I N I S E E A L N 392

CAC CTC GGG GAG ATT GGC ACC AAG ACC ACG CTG AGG TAT TCA GTG CAG CTG CTG ACC CCT 1266
H L G E I G T K T T L R Y S V Q L L T P 412

GCC AAC CTG CTG GCC AAG ATC AAC GGG AAG GAC AGC ATT GAG AAG GAG CAC GTG GAG GAG 1326
A N L L A K I N G K D S I E K E H V E E 432

ATC AGC GAG CTC TTC TAT GAC GCC AAG TCC TCC GCC AAG ATT CTG GCC GAC CAG CAG GAC 1386
I S E L F Y D A K S S A K I L A D Q Q D 452

AAG TAC ATG AAG TAA CGTAGGGTTT GGAGGTGCAC CCAGAGGACA GACCCACAC CGAGGACAGG 1451
K Y M K * 456

GTCTTGCGTT GAGCATGCTT TGCAGTGTTA CAGTTTGTTC GTAAATTATC AAACCTCCAA GGTGTGTTGG 1521

AAGGAACCTT TTCCACCTA GCTTGTTCCTA CTAATAAAAC TGAATCTTAT TTTGATGATA AAAAAA 1587

3

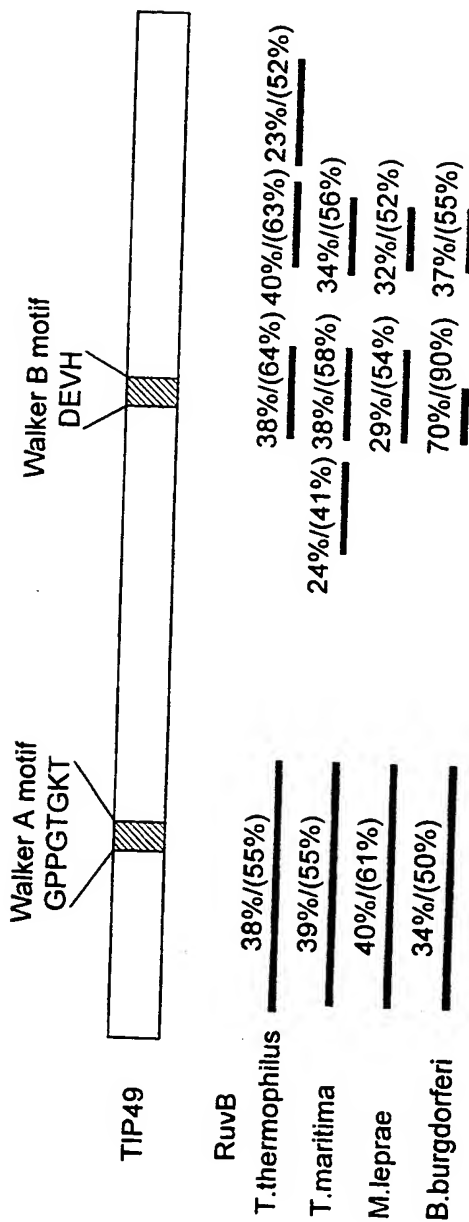



図4



Normal
12
24
48
1
3
5
7
12
24
48

DEN
(hours)

Carcinogenesis
(months)

Regenerating liver
(hours)

図5

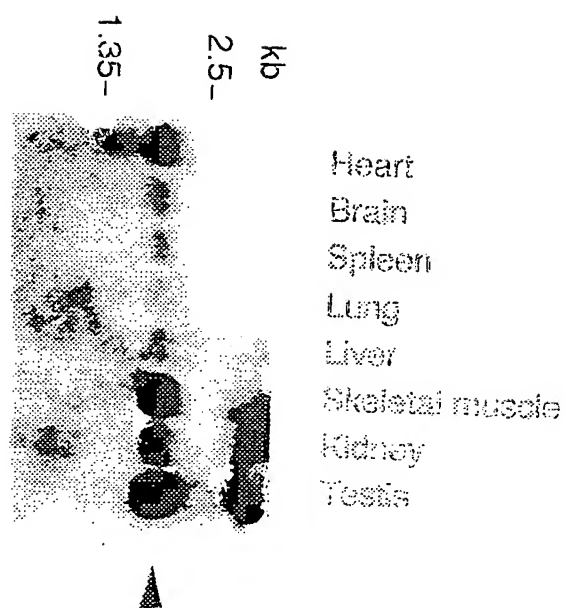


図6

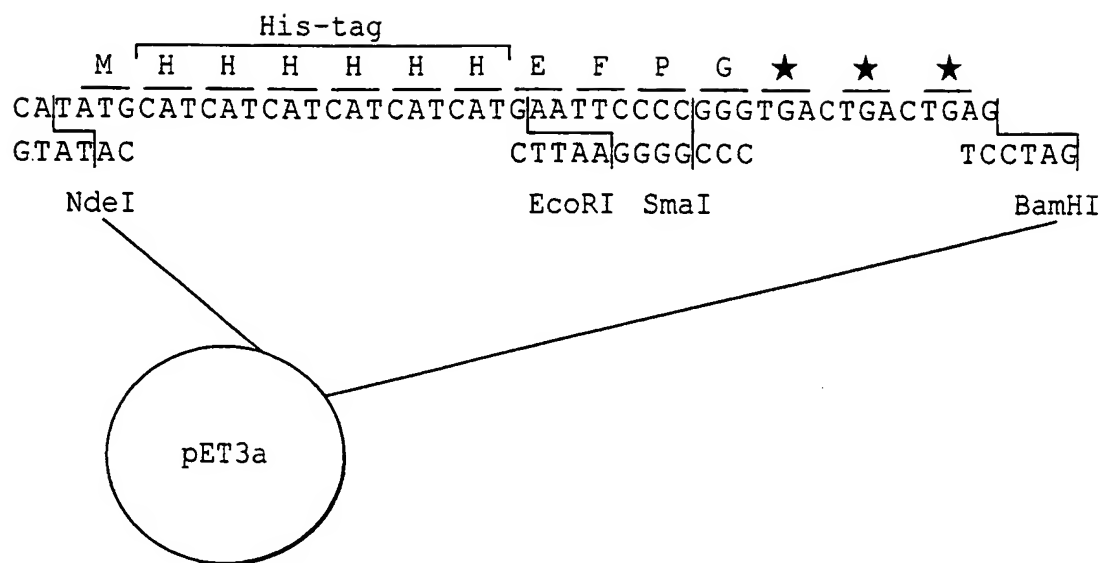


図7

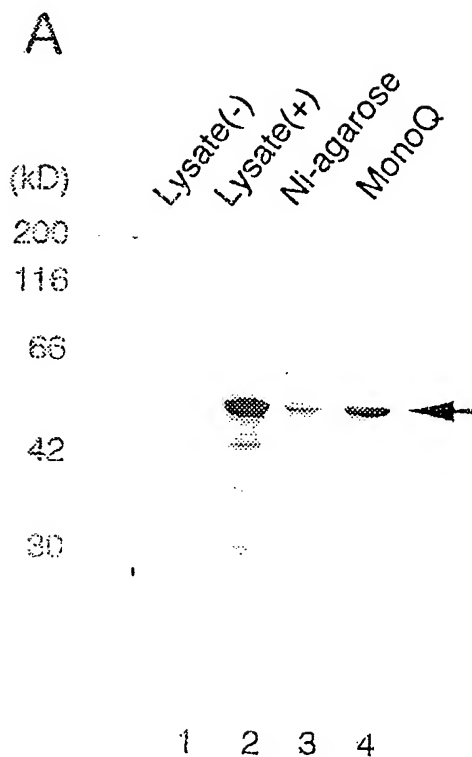


図8A

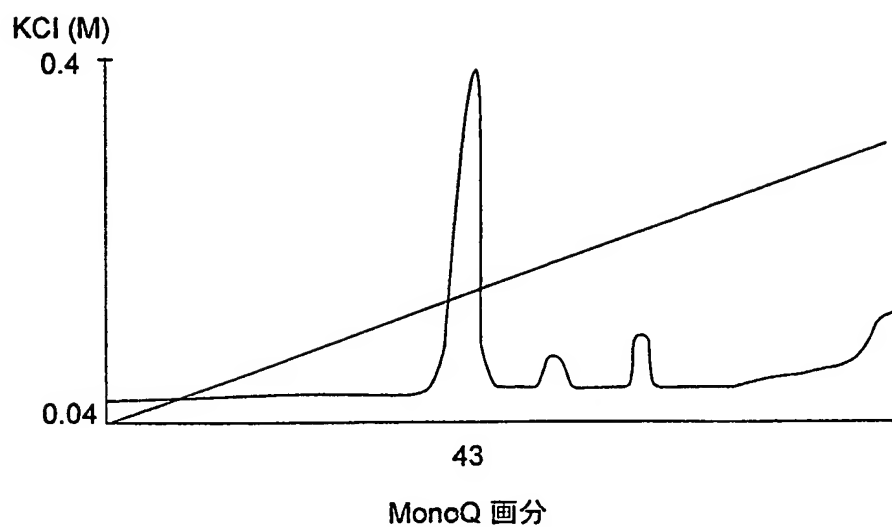


図8B

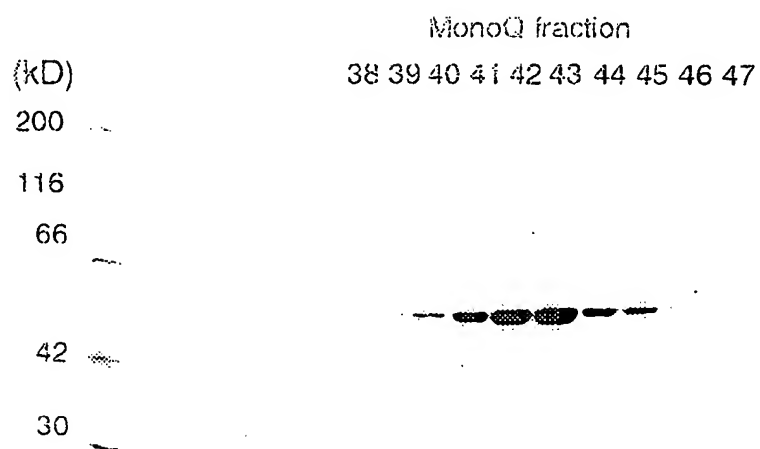


図9

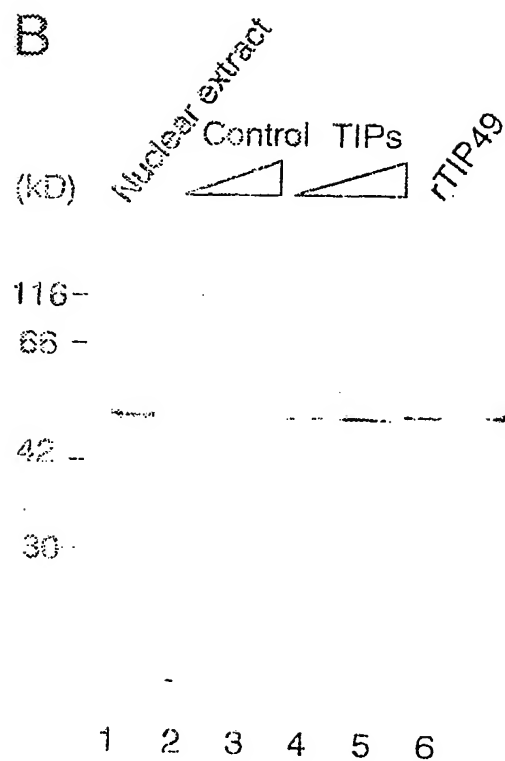


図10

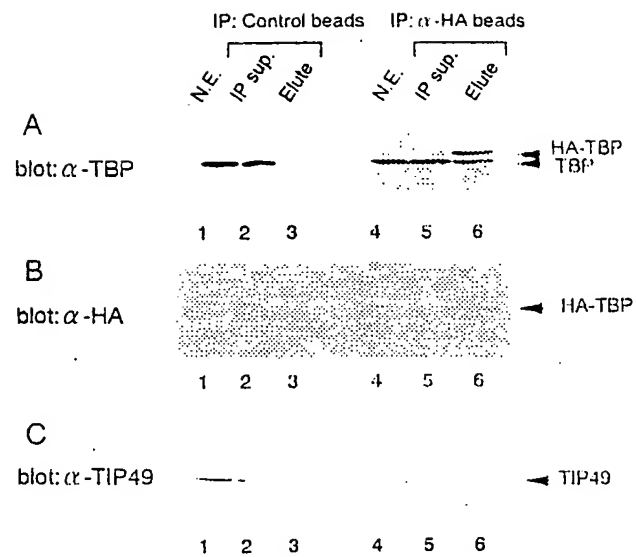


図11

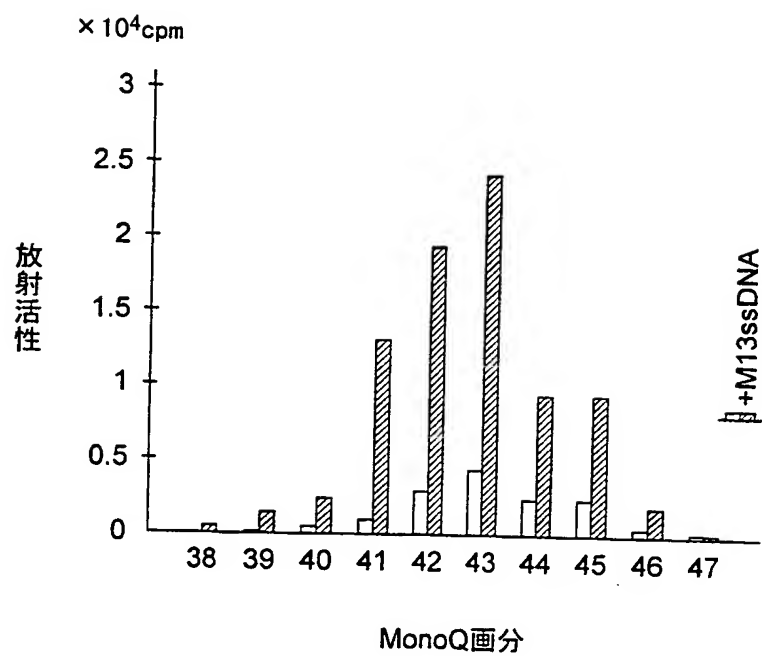


図12

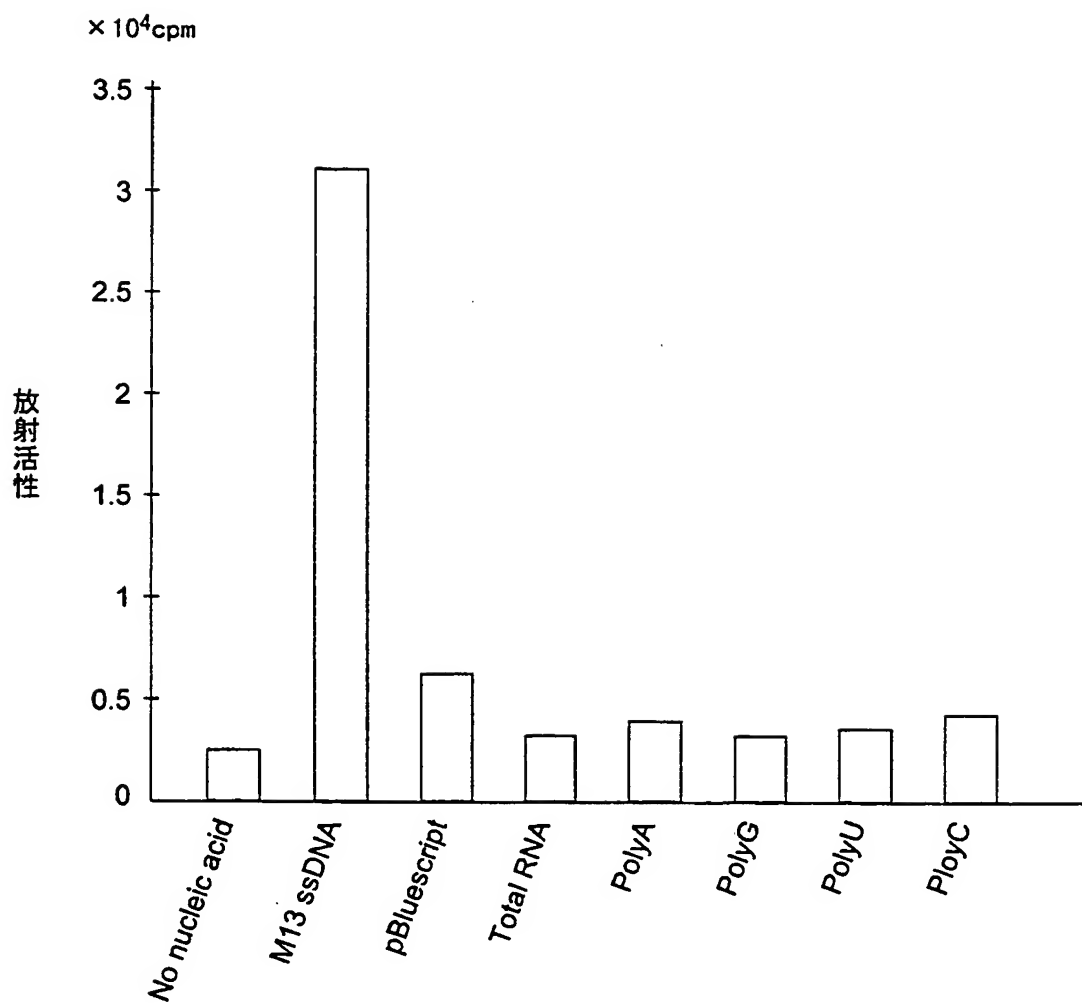
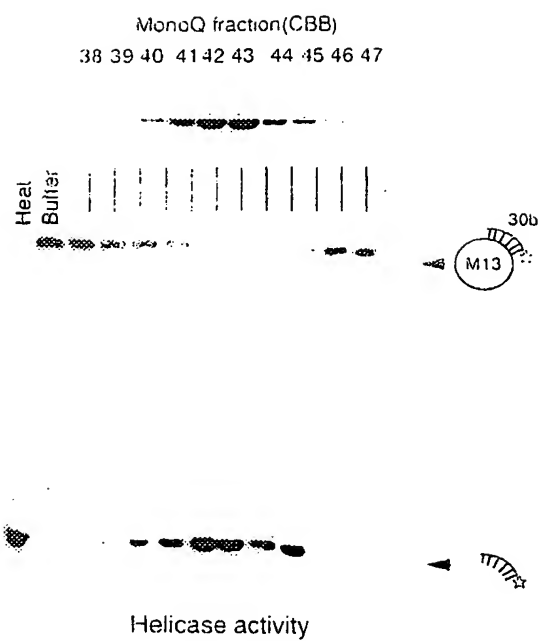


図13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02836

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/47, C12N9/14, C12N15/55, C12Q1/68, C07K16/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/47, C12N9/14, C12N15/55, C12Q1/68, C07K16/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Vol. 235 (1997-Jun-9) Masato Kanemaki et al., "Molecular Cloning of a Rat 49-kDa TBP-Interacting Protein (TIP49) That Is Highly Homologous to the Bacterial RuvB" p.64-68	1-18
A	GENES & DEVELOPMENT Vol. 8 (1994) David T. Auble et al., "Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism" p.1920-1934	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
August 25, 1998 (25. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K14/47, C12N9/14, C12N15/55, C12Q1/68, C07K16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K14/47, C12N9/14, C12N15/55, C12Q1/68, C07K16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Vol. 235 (1997-Jun-9) Masato Kanemaki et al. 「Molecular Cloning of a Rat 49-kDa TBP-Interacting Protein (TIP49) That Is Highly Homologous to the Bacterial RuvB」 p. 64-68	1-18
A	GENES & DEVELOPMENT Vol. 8 (1994) David T. Auble et al. 「Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism」 p. 1920-1934	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.08.98

国際調査報告の発送日

25.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449